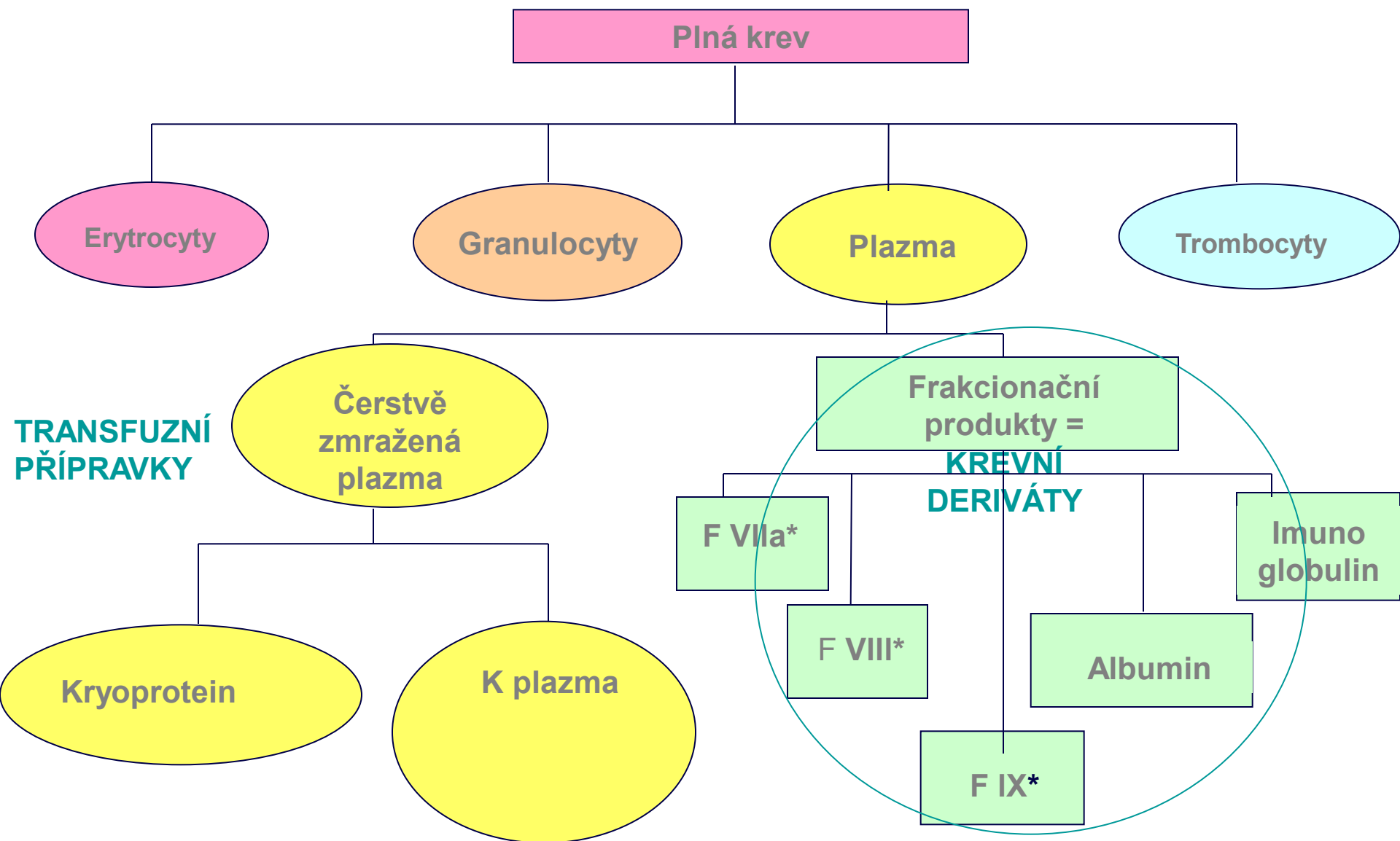


Předtransfuzní vyšetření

MUDr. Alena Pejchalová
TTO FN Brno



*k dsipozici i jako rekombinantní výrobky

Předtransfuzní vyšetření

- soubor povinně prováděných testů před podáním přípravku obsahujícího erytrocyty
- imunologické riziko transfuze – není garantovaná 100% bezpečnost – správná indikace
- alo/autoimunizace, imunosuprese, imunomodulace - potransfuzní reakce
- obvykle bezpečný proces = zvýšení hodnoty Hb (1TU zvýší Hb o 10-15g/l, přežívání erys cca 30-60 dní)

Předtransfuzní vyšetření

1. Fáze preanalytická

- Odběr a příprava vzorku, kontrola záznamů

2. Analytická

- Laboratorní vyšetření

3. Postanalytická

- Hodnocení, kontrola a výdej výsledku + navazuje výdej TP

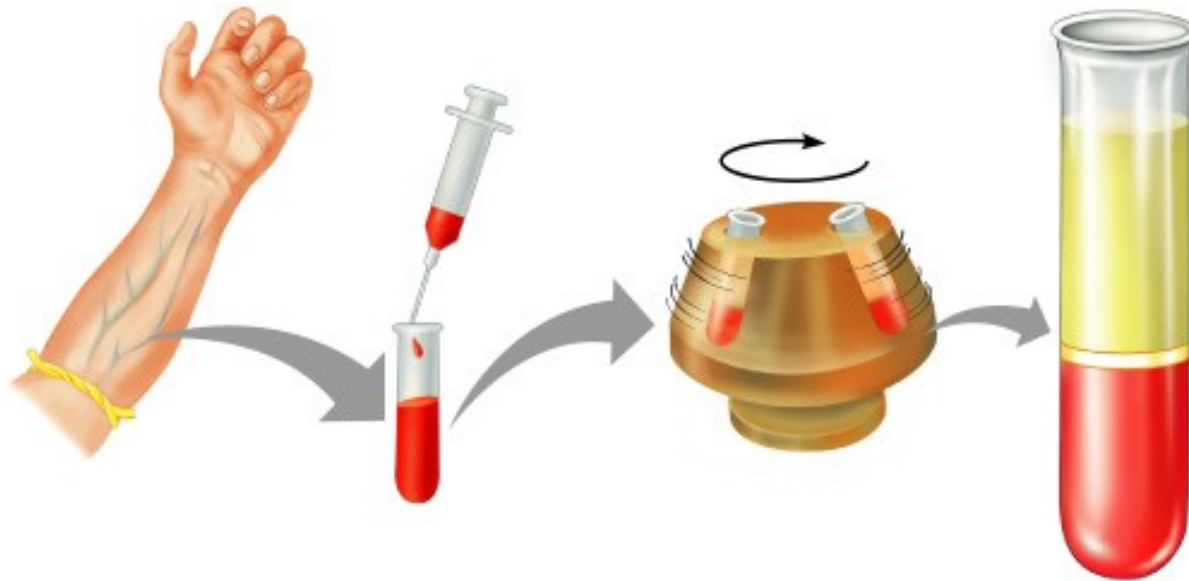
- Zajišťuje laboratoř krevní banky/imunohematologie

Krevní vzorky

- krev s antikoagulačním roztokem/plazma
- krev sražená /sérum
- nepoužívat hemolytické vzorky – nelze detekovat protilátky
- cave nestandardní vzorky/množství, vzhled

- skladování vzorků – změna jejich kvality (hemolýza, ztráta komplementu, zeslabení IgM Abs)
- plná krev při 2-8°C do 72 hodin od odběru/ 5-7 dní pro ostatní imunohematologická vyšetření

Preanalýza



Žádanka o transfuzi/předtransfuzní vyšetření

- písemná/elektronická
- telefonický požadavek - zaprotokolovat
- kontrola údajů - archivované záznamy
- nepřípustná dvojí dokumentace
- Jiná žádanka o výdej transfuzního přípravku, zasílá se v okamžiku, kdy je transfuze požadovaná

ŽÁDANKA O VÝDEJ TRANSFUZNÍCH PŘÍPRAVKŮ

Jméno a příjmení pacienta		Zdravotní poj.	Klinika / oddělení / NS (telefon, IČP)		
		Diagnóza	Fakultní nemocnice Brno Interní hematologická klinika Oudřov Jih tel: 532 233 052 Jihlavská 20, 625 00 Brno IČP: 72199173		
Rodné číslo (náhradní identifikátor)		Datum			
Krevní skupina pacienta			Transplantace kostní dřeně (kmenových buněk)		
			Datum transplantace	Krevní skupina dárce	
Erytrocyty	Pediatrická jednotka	Počet TU	Ozáření	Deleukotizace	Promytí
	množství v ml		ano <input type="checkbox"/>	ano <input type="checkbox"/>	ano <input type="checkbox"/>
Plazma	Pediatrická jednotka	Počet TU	Kryoprotein	Fibrinogen	
	ano <input type="checkbox"/>			množství v g	
Trombocyty	Pediatrická jednotka	Počet TD	Ozáření	Jméno a podpis lékaře	
	ano <input type="checkbox"/>		ano <input type="checkbox"/>		

Souhlas

- Údaje na štítku zkumavky:
 - jméno a příjmení, rodné číslo /nebo jiná jedinečná identifikace pacienta, datum odběru
- Údaje na žádance:
 - jméno a příjmení, rodné číslo / nebo jiná identifikace
 - imuno hematologická anamnéza
 - razítko lékaře, podpis sestry provádějící odběr
 - datum a čas odběru vzorku
 - počet TU a typ přípravku
 - datum a hodina transfuze – stupeň naléhavosti
 - diagnóza, pojišťovna, IČP

Vyšetření nelze provést, pokud:

- chybí informace o totožnosti pacienta
- jsou zásadní diskrepance mezi údaji na žádance a na zkumavce
- urgentní pacienti také vyžadují identifikaci

Administrativní chyby jsou nejčastější příčinou potransfuzních hemolytických reakcí (při záměně pacientů, záměně přípravků).

Komplex předtransfuzního vyšetření

1. stanovení krevní skupiny AB0 a RhD příjemce
2. vyšetření nepravidelných protilátek proti erys v plazmě/séru příjemce
3. (výběr erytrocytového přípravku)
4. test kompatibility mezi plazmou/sérem příjemce a erytrocyty dárce

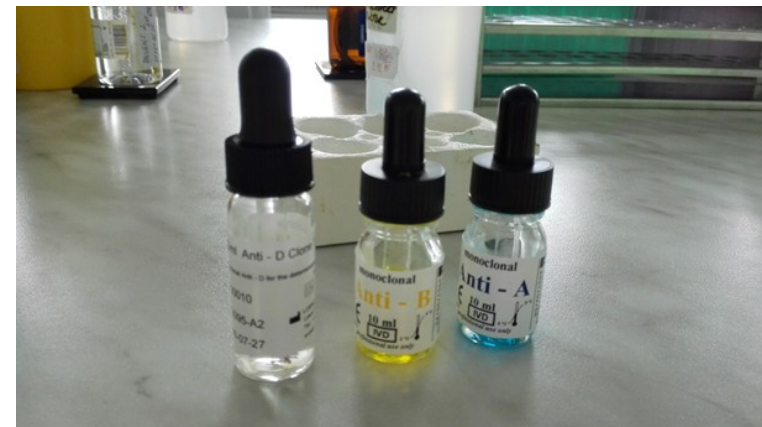
Platnost předtransfuzního vyšetření

- 72 hodin od času odběru vzorku pacienta
- krevní skupinu při prvním vyšetření určit celou, před dalšími transfuzemi erytrocytů potvrdit souhlas ABD antigenů z nového vzorku = identifikace vzorku
- screeningové vyšetření protilátek opakovat z nového vzorku krve transfundovaného pacienta nejpozději za 72 hodin
- platnost předtransfuzního vyšetření lze výjimečně prodloužit na 7 dnů u pacientů bez transfuzí erytrocytů a trombocytů

Stanovení AB0 skupiny

- Reciprocita při
 - vyšetření AB0 antigenů na erys (aglutinogeny)
 - vyšetření AB0 protilátek v séru/plazmě (aglutininy)
 - solný test/ přímá aglutinace/ laboratorní teplota cca 20°C
- do 4.měsíce věku 2x vyšetřit A a B antigeny odlišnými diagnostiky, bez detekce AB0 protilátek

Pacient	Erys pacienta		Sérum pacienta	
	Anti-A	Anti-B	A erys	B erys
Zjištěná skupina				
O	-	-	+	+
A	+	-	-	+
B	-	+	+	-
AB	+	+	-	-



Stanovení RhD

- pomocí dvou anti-D (IgM) dg. sér přímou aglutinací /solný test, laboratorní teplota
- dg. sérum nesmí detekovat D^{VI} variantu
 - pacient se známou variantou D antigenu má být transfundován RhD negativní krví
 - pacient se známým weak D antigenem může být dle typu antigenu považovaný za RhD pozitivního
- Rozdíl ve vyšetření pro dárce krve: povinnost testovat dárce na přítomnost variantních D antigenů (Dw/v) v NAT
 - dárce s jakýmkoli Dw/v = označení transfuzního přípravku RhD+ /jako pacient je přitom tento dárce považován za RhD-

Screening nepravidelných protilátek

- vyšetření plazmy příjemce na přítomnost **nepravidelných protilátek** proti erys
 - pomocí známých diagnostických **erytrocytů skupiny 0**
 - povinné zastoupení **určitých antigenů/krevních skupin/** včetně konkrétních kombinací (C, C^w, c, D, E, e, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, M, N, Le^a).
- pro dárce krve lze použití směs dg. erytrocytů (pool)
- pro pacienty nemůže být směs použita (podmínkou jsou tři a více typů dg. erys)
- povinně testy LISS-**NAT** 37°C/ sloupc. aglutinace, pevná fáze, zkumavkově
- někdy vhodné doplnění o enzymový test (lépe reagují anti-Rh,-Jk, u potransfuzní reakce)

Diagnostické erytrocyty



Další postup

- pozitivní screening protilátek je nutno došetřit, identifikovat protilátku
- rozlišit aloprotilátky / autoprotilátky / jiné typy reakcí
- typizace antigenu korespondujícího protilátce na erys pacienta umožní stanovit auto/aloprotilátku
- určit klinický význam protilátky/ NAT - dle toho výběr odpovídajících dárcovských erytrocytů antigen-negativních nebo jen kompatibilních v NAT

Příloha 1. Klinická závažnost protilátek proti erytrocytům

Specifita	Klinická závažnost	Výběr transfuzního přípravku
Anti-A, anti-B	Vždy ano	AB0 kompatibilní
Rh protilátky (reagující v NAT) Anti-D, -C, -c, -E, -e	Ano	Negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
Anti -C ^w		Negativní test kompatibility Ve směsi s jinou protilátkou negativní pro daný antigen
Kell protilátky (anti-K, -k)	Ano	Negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
Anti-Kp ^a	vzácně	Negativní test kompatibility Ve směsi s jinou protilátkou negativní pro daný antigen
Duffy protilátky (anti-Fy ^a , -Fy ^b)	Ano	Negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
Kidd protilátky (anti-Jk ^a , -Jk ^b)	Ano	Negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
Anti-S, -s, -U	Ano	Negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
Anti-A ₁ , -P ₁ , -N	Vzácně	Negativní test kompatibility
Anti-M (nereagující při 37 °C)	Vzácně	Negativní test kompatibility
Anti-M (reagující při 37 °C)	Někdy ano	Negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
Anti-Le ^a , -Le ^{a+b}	vzácně	Negativní test kompatibility
Anti-Le ^b	ne	Lze ignorovat
Anti-Lu ^a	Vzácně	Negativní test kompatibility
Protilátky s vysokým titrem a nízkou aviditou (HTLA)	nepravděpodobná	Podle doporučení specializované či referenční laboratoře
Protilátky proti antigenům s nízkou/vysokou frekvencí	Podle specifity	Podle doporučení specializované či referenční laboratoře

Výběr transfuzního přípravku

- AB0 a RhD shoda se skupinou pacienta
- pokud nelze, tak erytrocyty kompatibilní pro AB0 protilátky u příjemce nebo erytrocyty skupiny 0
- pro příjemce skupiny AB erytrocyty skupiny A,B nebo 0
- pro fertilní ženy rezervovat erytrocyty K-, u RhD negativních typ cce
- erytrocyty 0 jsou „univerzální“
- plazma AB je „univerzální“
- co nejdříve přejít na skupinově shodné přípravky

Test kompatibility

- potvrdí slučitelnost krve příjemce a dárce
- reakce mezi plazmou/sérem příjemce a erytrocyty dárce (segment z vaku TU)
- sérologický test nebo elektronický výběr



- **LISS/NAT test** - povinně při nálezu u klinicky významné protilátky nebo problémech při vyšetření krevní skupiny, u ABO inkompatibilního transplantátu solidního orgánu
- type and screen – rychlé ověření ABO kompatibility před výdejem TP u příjemce bez protilátek proti erys

Test kompatibility

Pomůžte

Verifikovat ABO kompatibilitu dárce
Detekovat většinu protilátek u příjemce

Nemůžte

Garantovat normální přežívání erys
Zabránit aloimunizaci erys antigeny
Zachytit všechny protilátky
Zabránit pozdní potransfuzní reakci
Nalézt chyby při vyšetření ABOD

Kontrola kvality v imunohematologické laboratoři

minimální požadavky

kontrolovaný produkt	použitá kontrola	frekvence
AB0 dg.séra AB0 dg.erys	A1 a B erys 0 sérum	každá série vyš. 1x denně
RhD stanovení	RhD+ erys RhD- erys Rh ctl	každá série vyš. 1x denně
ostatní dg.séra	Ag+ /heterozyg/ erys Ag- erys	každý test
skreening Abs	slabé Abs (-D,-Fy)	série vyšetření 1x denně
identifikace Abs	autoctl	každý test

Urgentní situace

- Nedostatek času na jakékoli vyšetření
- Chybí krevní vzorek pacienta

Vydávají se univerzální transfuzní přípravky, tj.

- 0 erytrocyty (0- mladé ženy a děti)
- AB plazma
- neprovádí se celé předtransfuzní vyšetření, ale dokončí se později
- je imunohematologické riziko non-AB0 inkompatibility

Tolerovaný čas*	Provedené testy	Vydání přípravek	Komentář
Ihned	Žádné	Ery: 0neg P: AB	Vzorek odebraný před substitucí
>10min	AB0/D	Ery: AB0/D shodné P: AB0 shodná	Ověření AB0/D antigenů
>20min	AB0/D	Ery: AB0/D shodné P: AB0 shodná	Vyšetřena KS včetně AB0 aglutininů
≥45min	AB0/D Screening Ab Zk.kompatibility	Ery: AB0/D shodné a kompatibilní P: AB0 shodná	Výjimečně zkrácení inkubace o 5min

*po dodání vzorku
Ab=protilátky

Ery=přípravky obsahující erytrocyty

P= plazma

Vydání AB0/D shodného nebo kompatibilního transfuzního přípravku závisí na naléhavosti podání transfuze. Rozhodující je čas od dodání vzorku na laboratoř. Volba přípravku v závislosti na časovém intervalu, který je k dispozici pro provedení povinných testů před podáním transfuze, se řídí schematem v tabulce.

Masivní transfuze

- objem převedených transfuzních přípravků během posledních 24 hodin je větší než krevní objem příjemce
- přepočet pro objem krve: hmotnost (kg) x 69 muži
x 65 ženy
obvykle více jak 10 TU ery
- není nutné provádět předtransfuzní vyšetření
- ověřuje se pouze AB0 shoda/kompatibilita přípravku

Jiné specifické transfuze

- fetální/neonatální tranfuze
 - čerstvá krev s vysokým HTK, CMV negativní, ozářená a podaná do 24 hod. od ozáření
- chronicky transfundovaní pacienti
 - střední a vyšší riziko imunizace, je vhodné vybírat shodné fenotypy erytrocytů zvláště pro vybrané diagnózy
- příjemci transplantátu
 - vyloučit vznik imunních komplexů a cytotoxické reakce /oddálení přihojení, akutní rejekce
 - výběr přípravku dle typu neshody dárce a příjemce
 - univerzálně erytrocyty 0, plazma AB

Hemolytické onemocnění novorozence

Hemolytické onemocnění novorozence

- hemolýza erytrocytů fetu/novorozence způsobená mateřskými protilátkami
- protilátky proti zděděnému paternálnímu antigenu fetu
- při neshodě/inkompatibilitě matky a dítěte v některé krevní skupině, nejčastěji v antigenech AB0 a D
- IgG protilátky jsou aktivně vychytávané receptory placentárních buněk
- různá závažnost onemocnění (podle specifity, množství a vlastností Ig, aktivity monocyto-makrofágového systému fetu aj.)

HON

- V důsledku
 - AB0 inkompatibility
 - časté, obvykle nezávažné onemocnění
 - není imunohematologická prevence/ AB0 titry neprediktivní
 - Rh inkompatibility
 - při anti-D, -c často závažné onemocnění
 - existuje prevence imunizace antigenem D
 - depistáž těhotných
 - anti-D profylaxe
 - Inkompatibility v jiných skupinách
 - různá manifestace HON, závažné často u protilátek proti antigenům Kell systému (hemolýza, aplázie erytropoezy)

- v sekundární imunitní odpovědi je v další graviditě vyšší produkce protilátky
- riziko postižení novorozence u dalších (zvláště Rh inkompatibilních) gravidit až 70%
- predikce postižení chybí u AB0 neshodných gravidit
- různé klinické projevy nemoci: fetální anemie, hyperbilirubinémie, extramedulární erythropoéza, hepatosplenomegalie, portální hypertenze
- laboratorní testy potvrdí diagnózu/klinický nález

Jiné imunitní cytopenie kromě hemolýzy

- Aloimunní fetální/novorozenecká trombocytopenie
- Aloimunní fetální/novorozenecká neutropenie
- Obě kategorie rizikové pro plod/novorozence – cerebrální krvácení, těžké infekty

Antenatální laboratorní vyšetření těhotných žen - cíl

AB0 a D typizace:

identifikuje D negativní ženy, které
vyžadují anti-D profylaxi

Screening a identifikace protilátek:

1. detekuje klinicky významné Abs, které
mohou vést k postižení fetu/novorozence
2. předchází možným problémům při
předtransfuzním vyšetření

Imunohematologické vyšetření v těhotenství

- 1. imunohematologický screening 12.-16.týden
 - Krevní skupina
 - Screening/identifikace/titr nepravidelných protilátek proti erys
- 2. imunohematologický screening ve 28. týdnu/ před RhIg profylaxí
 - Krevní skupina
 - Screening /identifikace/titr nepravidelných protilátek proti erys

Průkaz klinicky významné protilátky: pravidelné sledování specifity a množství protilátky (titrační stanovení) přibližně každý měsíc event. častěji od 24. týdne gravidity.

Titř protilátek

Významný titř

- anti-D, -C, -E ≥ 32
- anti-K ≥ 4
- ostatní: ≥ 64

Stanovení titřu v LISS/NAT

Při překročení titřu „klinicky významného“ dále monitorovat plod jinými metodami – UZV zaměřené na anemii fetu

Rutinní podání anti-D/profylaxe ve 28.týdnu těhotným D- a ženám D- po porodu D+ novorozence

Další možná antenatální vyšetření

- Vyšetření otce = stanovení krevních skupin (např. Kk)
- Vyšetření plodu = genotypování *RHD*, *RHCE* po izolaci fetální *DNA* z krve matky
- Vyšetření umbilikální krve = imunohematologické vyšetření krve plodu

Postnatální vyšetření

Obvykle se provádí u novorozenců

- Žen RhD negativních
 - stanovení krevní skupiny, PAT
- Žen skupiny 0
 - Stanovení krevní skupiny, imunních AB0 protilátek, PAT
- U dětí s klinickým nebo laboratorním nálezem pro HON
 - Stanovení krevní skupiny, screening protilátek, imunní AB0 protilátky, PAT ev. další došetření
- V rámci předtransfuzního vyšetření

Autoimunitní hemolytické anemie

Hemolytické anemie

Skupina onemocnění charakterizovaná zkráceným přežíváním erytrocytů

Dg. kritéria:

- Klinické a laboratorní známky hemolýzy
- Klinické a laboratorní známky anemie dle stupně kompenzace kostní dřeně
- Protilátky a/nebo aktivovaný komplement navázané na erytrocyty a/nebo volné protilátky v plazmě/séru

Laboratorní známky hemolýzy

- *Zvýšená erythropoeza* (elevace počtu rbc, erytroidní hyperplazie dřeně, snížení poměru G/E)
- *Zvýšená destrukce erytrocytů*
 - biochemické parametry: elevace LD, nekonj.bilirubinu, snížení sér.haptoglobinu, hemoglobinemie, hemoglobinurie, hemosiderinurie
 - morfologické změny erytrocytů (schistocyty)
 - zkrácené přežívání erytrocytů

AIHA patogeneze

*Vznik IgG protilátek proti autoantigenům erytrocytů
K tomu nutná pomoc T_h lymfocytů (jejich patologické populace)*

- Tyto „spící“ autoreaktivní T_h mohou být aktivované zkříženě reagujícími aloantigeny, autoantigeny, mikrobiálními superantigeny, změnami v procesu prezentace a zpracování antigenu

AIHA patogeneze

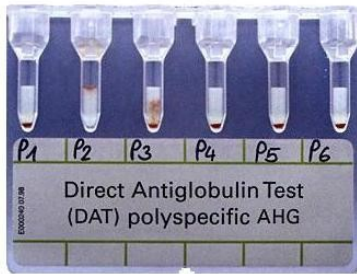
Protilátkový typ reakce s účastí nebo bez účasti komplementu(C)

- Senzibilizované erythrocyty (IgG) reagují s receptory makrofágů – kompletní nebo parciální fagocytóza – sférocyty – extravaskulární hemolýza
- Senzibilizované erys (C3) reagují s receptory makrofágů – fagocytóza a extravaskulární lýza nebo podléhají kompletní aktivaci C a lýze itravaskulární

Laboratorní vyšetření AIHA

PAT

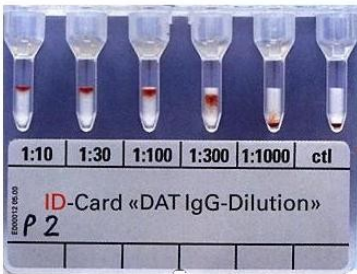
- AGH séra polyspecifická (anti-IgG+C3)
 - AGH séra monospecifická
 - stanovení množství protilátky (titrace)
 - event. další charakteristika autoprotiátky (podtřídy)
-
- Zásadní je interpretace výsledků v kontextu klinických a ostatních laboratorních vyšetření



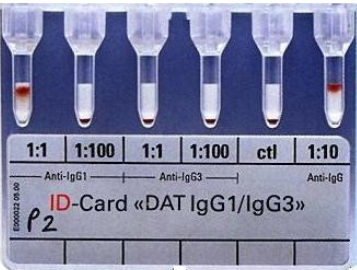
Negative	Negative
< 2+	Very weak positive
≥ 2+	Monospecific DAT card is recommended



Negative	Negative
< 2+ (IgG)	Weak positive (IgG) (not titrated)
≥ 2+ (IgG)	IgG-Dilution (titration) card is recommended



Negative	Negative
< = 1:30	Weak positive (IgG) Low risk of haemolysis
> 1:30	Strong positive (IgG) High risk of haemolysis



Interpretation of result: Positive 1:1 – moderate risk of haemolysis Positive 1:100 – high risk of haemolysis	The ID-Card «DAT IgG1/IgG3» shows the clinical importance of a DAT, sensitized by IgG1 and/or IgG3 antibodies.
--	---

Laboratorní vyšetření AIHA

screening protilátek

- vyšetření plazmy/séra pacienta proti dg. erys 0 (screening protilátek)
- vyšetření při 37°C a také při 20°C
- došetření teplotní amplitudy a titru protilátek při pozitivitě v testu při 20°C

- spolu s PAT pomůže diferencovat typ AIHA
- dle toho další testy

Typy AIHA

- AIHA s tepelnými protilátkami
- AIHA s chladovými protilátkami
- Kombinovaná AIHA
- Poléková AIHA

AIHA s tepelnými protilátkami

- obvykle IgG autoprotiátky
- vázané na erytrocyty i rozpuštěné v plazmě/séru
- 67% IgG+C3, 20% pouze IgG, 13% pouze C3
- reagují v testech při 37°C
- dobře reagují v enzymových testech
- komplikují testy kompatibility

Charakteristika: PAT pozitivní pro IgG a/nebo C3.
Screening protilátek 37°C pozitivní.
Testy kompatibility pozitivní.
Chladové protilátky nepřítomny.

AIHA s chladovými protilátkami

- přítomné patologické chladové protilátky
- PAT+ pro komplement (C3 složku)
- volné protilátky reagují v testu při 20°C
- jejich titr je při 4°C vyšší než 256 nebo reagují až do 30°C

Charakteristika : PAT pozitivní pro C3.

Přítomné patologické chladové protilátky ve vysokém titru.

Problémy při vyšetření krevní skupiny.

Management pacientů s AIHA

- složité, časově náročné vyšetření při provedení všech doporučených procedur

Minimálně:

- precizní vyšetření krevní skupiny
- rozlišení PAT
- rozlišení protilátek (chladové, auto- a aloprotilky)
- fenotypizace dalších krevních skupin pacienta
- výběr vhodného transfuzního přípravku (respektovat aloprotilátky)